

# VU Research Portal

## Matching intended use and type of HPV test in research and clinical practice

Geraets, D.T.

2015

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Geraets, D. T. (2015). *Matching intended use and type of HPV test in research and clinical practice*. [PhD-Thesis – Research external, graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## SAMENVATTING

Baarmoederhalskanker is wereldwijd de vierde meest voorkomende kanker bij vrouwen. Infectie van het cervicale epitheel met een humaan papillomavirus (HPV) kan leiden tot de ontwikkeling van cervicale intra-epitheliale neoplasie (CIN) en uiteindelijk baarmoederhalskanker. Deze ontdekking heeft geleid tot de ontwikkeling van verschillende HPV testen (meer dan 125 assays momenteel beschikbaar) en twee gelicentieerde profylactische HPV vaccins.

HPV testen in epidemiologische studies vereisen een hoge analytische gevoeligheid en specificiteit en het vermogen om verschillende HPV's individueel te identificeren (genotypering). Deze tests kunnen worden gebruikt 1) om de werkzaamheid van een HPV vaccin tegen verschillende surrogaat-eindpunten voor baarmoederhalskanker te bepalen, van persisterende HPV infectie tot hooggradige CIN laesies (CIN2+) geassocieerd met HPV's waartegen het vaccin is gericht, 2) om de effecten van de landelijke vaccinatie op de prevalentie van HPV genotypen (en eventueel "type replacement") binnen een geïmmuniseerd cohort te monitoren, en 3) ten behoeve van het onderzoek naar de prevalentie van individuele HPV typen in (pre)maligne aandoeningen.

Binnen een klinische setting moeten HPV testen HPV infecties opsporen die voornamelijk geassocieerd zijn met klinisch relevante ziekte, oftewel CIN2+ laesies (klinische gevoeligheid), terwijl de detectie van voorbijgaande HPV infecties die niet geassocieerd zijn met CIN2+ (klinische specificiteit) wordt beperkt. Deze testen richten zich op de gezamenlijke detectie (gepoolde detectie) van 13-14 zogenaamde hoog-risico (hr)HPVs, oftewel de HPV's die de hoogste associatie met baarmoederhalskanker hebben. Het beoogde gebruik van hrHPV testen in de klinische praktijk is 1) primaire screening op baarmoederhalskanker, 2) triage van vrouwen met licht afwijkende cytologie, en 3) "test-of-cure" na behandeling voor hooggradige CIN. Het nut van hrHPV genotypering in de klinische praktijk is

niet vastgesteld, maar kan zinvol zijn voor HPV16 en HPV18, de typen die het hoogste risico op baarmoederhalskanker geven.

In dit proefschrift hebben we een aantal bestaande en nieuwe PCR-gebaseerde technologieën voor de identificatie van HPV's geëvalueerd, en deze toegepast in epidemiologische en klinische studies in overeenstemming met het beoogde gebruik. Het proefschrift bestaat uit drie delen: 1) de beoordeling van de analytische nauwkeurigheid van een aantal recent ontwikkelde testen voor HPV genotypering (**Hoofdstukken 2-5**), 2) de toepassing van (nieuwe) technieken voor HPV typering binnen een aantal onderzoeksdoeleinden (**Hoofdstukken 6-9**), en 3) de bruikbaarheid van nieuwe methoden voor hrHPV detectie en voor zelf-afname van materiaal binnen een klinische setting (**Hoofdstukken 10-11**).

### Deel 1: Analytische nauwkeurigheid van assays voor HPV genotypering

In **Hoofdstuk 2** hebben we onderzocht of de nieuwe INNO-LiPA HPV Genotyping Extra test (INNO-LiPA), gebaseerd op de SPF<sub>10</sub> PCR, beschikt over voldoende analytische nauwkeurigheid om te worden gebruikt voor epidemiologisch HPV onderzoek. De gepoolde (algemene) detectie van HPV en identificatie van individuele HPV genotypen door INNO-LiPA is vergeleken met de originele SPF<sub>10</sub> LiPA<sub>25</sub> (versie 1), een wereldwijd toegepast HPV algoritme met analytische gevoeligheid en specificiteit. Hiervoor hebben we een panel gekozen van cervicale uitstrijkjes en bipten, de twee soorten monsters die meestal gebruikt worden in epidemiologisch HPV onderzoek en in studies naar de werkzaamheid van HPV vaccins. INNO-LiPA is minder geschikt voor deze doeleinden dan SPF<sub>10</sub> LiPA<sub>25</sub> (versie 1), gebaseerd op een verminderde detectie van HPV in het algemeen (gepoolde detectie) en van HPV genotypen individueel (genotypering) in beide soorten monsters.

Binnen een klinische setting zou een nauwkeurige identificatie van individuele hrHPVs waardevol kunnen zijn voor de verdere risicostratificatie van vrouwen die positief zijn getest via screening op baarmoederhalskanker met gepoolde hrHPV detectie. In **Hoofdstuk 3** en **Hoofdstuk 4** presenteren we twee testen die beschikken over volledige HPV genotypering en gebruik maken van amplimeren gegenereerd door de GP5+/6+ PCR, een hrHPV test die in meerdere, longitudinale studies klinisch gevalideerd is voor screening op baarmoederhalskanker. De GP5+/6+ strip (voorheen op de markt gebracht als *digene* HPV genotypering RH Test) is eenvoudig te gebruiken en geschikt voor “low throughput” doeleinden. De GP5+/6+ LMNX (voorheen op de markt gebracht als *digene* HPV genotypering LQ Test), gebaseerd op Luminex-beads, kan worden toegepast in “high throughput” omgevingen. De GP5+/6+ strip en GP5+/6+ LMNX hebben een hoge concordantie laten zien met de Reverse Line Blot, een gevestigde “in-house” methode voor GP5+/6+ PCR-gebaseerde genotypering, respectievelijk in **Hoofdstuk 3** en **Hoofdstuk 4**.

De Amplicor® HPV test (Amplicor) is een test voor de gepoolde detectie van hrHPVs en vereist de uitvoering van een vervolgtest voor de identificatie van HPV genotypen. In **Hoofdstuk 5** hebben we aangetoond dat de amplificatie-producten die gegenereerd zijn door Amplicor, direct kunnen worden getypeerd met behulp van de GP5+/6+ strip en GP5+/6+ LMNX. Zodoende bieden deze assays de mogelijkheid tot universele genotypering vanwege hun compatibiliteit met amplificatie-producten afkomstig van verschillende primer sets, zoals GP5+/6+ en Amplicor.

### Deel 2: Toepassing van assays voor HPV genotypering in epidemiologische studies

In **Hoofdstuk 6** werd het SPF<sub>10</sub> LiPA<sub>25</sub> (versie 1) algoritme toegepast om de prevalentie van en de determinanten voor HPV genotype infecties te bepalen

in een geselecteerd multi-etnisch cohort voorafgaand aan de start van een vaccinatieprogramma in Paramaribo, Suriname. De pre-vaccinatie prevalentie van hrHPVs was hoog en vergelijkbaar met die van Latijns-Amerikaanse landen en andere landen in het Caribisch gebied. Onafhankelijke determinanten van HPV infectie waren het aantal recente seksuele partners, gelijktijdige infectie met *Chlamydia trachomatis*, seksueel contact met iemand van een andere etnische afkomst, en etnische groep. Deze basisgegevens maken het mogelijk om na vaccinatie veranderingen in de HPV genotype prevalentie onder de bevolking van Paramaribo, Suriname, te monitoren.

**Hoofdstuk 7** beschrijft de HPV genotype distributie in de grootste wereldwijde collectie van bipten van invasieve baarmoederhalskanker (n = 10.575) tot dusver, met behulp van een gemeenschappelijk protocol voor selectie van monsters, pathologie beoordeling en HPV test algoritme (met SPF<sub>10</sub> LiPA<sub>25</sub> [versie 1]). Ondanks de geografische verschillen, hadden HPV typen 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, en 58 de hoogste prevalentie in baarmoederhalskanker en dienen derhalve prioriteit te krijgen in de beoordeling van de (kruis-)beschermende effecten van reeds gelicentieerde en nieuwe profylactische HPV vaccins. Baarmoederhalskankers gerelateerd aan HPV typen 16, 18, of 45 presenteerden zich op een jongere gemiddelde leeftijd dan die gerelateerd aan andere HPV typen. Dit onderstreept hun relevantie als doelwit in baarmoederhalskanker screening gebaseerd op hrHPV detectie.

In dezelfde verzameling van baarmoederhalskankers hebben we via een nieuwe sequentiemethode de singuliere aanwezigheid aangetoond van HPV typen, die zelden doelwit zijn van bestaande assays voor HPV genotypering (**Hoofdstuk 8**). Het voorkomen in baarmoederhalskanker van zeldzame HPV typen, die zijn geclassificeerd als mogelijk hoog-risico (WHO IARC Klasse 2B; 2,3%), was veel lager dan dat van reeds bevestigde hrHPVs

(Klasse 1/2A; 97,5%) en daardoor klinisch minder relevant. Desondanks versterkt hun aanwezigheid als enkelvoudige infectie in baarmoederhalskanker het indirecte bewijs voor een kankerverwekkende rol, vergelijkbaar met die van de phylogenetisch verwante Klasse 1/2A HPV's met bevestigde en veel hogere carcinogeniteit.

HPV16 is zeer virulent en het meest voorkomende type in baarmoederhalskanker. In **Hoofdstuk 9** voerden we een longitudinaal onderzoek uit naar het natuurlijk verloop van infecties met verschillende genetische varianten van HPV16. HPV16 varianten werden individueel gekarakteriseerd door middel van een speciaal ontworpen test die toegepast is op cervicale uitstrijkjes, het materiaal van hele weefsel coupes en zogenaamde “laser-capture micro-dissection” regio's van bipten afgenomen bij vrouwen in de controlegroep van een vaccin trial. Het HPV16 genotype dat consistent gedetecteerd wordt in vervolg afnames betreft doorgaans een persisterende infectie met dezelfde variant. We vonden dat meerdere HPV16 varianten in dezelfde vrouw zelden worden waargenomen, in tegenstelling tot het optreden van meervoudige HPV genotypen.

### Deel 3: Toepassing van assays voor HPV genotypering in klinische studies

Detectie van hrHPV met de GP5+/6+ LMNX zou een geschikte alternatieve methode zijn voor de klinisch gevalideerde EIA, eveneens gebaseerd op GP5+/6+ PCR. De voordelen van uitlezing door LMNX ten opzichte van de EIA zijn de “high throughput” capaciteit, de interne controle op een goede kwaliteit van het monster, en de individuele identificatie van 14 hrHPV genotypen, indien gewenst. In **Hoofdstuk 10** is

aangetoond dat de klinische waarde van de GP5+/6+ LMNX niet-inferieur was aan die van de GP5+/6+ EIA, zoals bleek toen deze testen werden uitgevoerd op een validatiepanel van klinische monsters verzameld door een internationaal consortium voor klinische validatie van testen voor HPV genotypering (VALGENT). Op basis van deze bevindingen is de GP5+/6+ LMNX een geschikte “stand-alone” hrHPV test voor primaire screening op baarmoederhalskanker.

**Hoofdstuk 11** beschrijft de klinische evaluatie van de FTA solid-state carrier cartridge, een nieuw hulpmiddel voor de opslag van zelf-afgenomen cervicovaginale monsters. Dit hulpmiddel heeft potentieel nut voor “non-responders” in landen met screening op baarmoederhalskanker en voor vrouwen in ontwikkelingslanden. In een cohort van vrouwen die zijn doorverwezen vanwege abnormale cytologie, is zowel een zelf-afgenomen (FTA) als een conventioneel door de arts afgenomen (in vloeistof bewaard) cervicaal monster getest op hrHPV met de SPF<sub>10</sub> LiPA<sub>25</sub> (versie 1) en de GP5+/6+ LMNX. HrHPV detectie was lager in het FTA zelf-afgenomen monster met beide testen. Echter, de combinatie van de FTA-gebaseerde zelf-afname met de SPF<sub>10</sub> LiPA<sub>25</sub> (versie 1) hrHPV test benaderde de klinische waarde van de GP5+/6+ LMNX op een conventioneel, door de arts afgenomen monster. Dit onderstreept de noodzaak voor een klinische validatie van het volledige diagnostische proces, dat wil zeggen, hulpmiddel voor monster afname, opslagmedium, verwerking, HPV amplificatie en uitlees-methode.

Tenslotte plaatsen we in **Hoofdstuk 12** de bevindingen in dit proefschrift in de context van andere studies en bespreken we de mogelijke toekomstperspectieven.

